

(続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                          |    |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 博士（薬学）                   | 氏名 | 中村 篤史 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 細胞時計を操る亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製 |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                          |    |       |
| 序論                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                          |    |       |
| <p>生体を構成する30兆個の細胞には生体リズムを調節する時計機能（細胞時計）が備わっており、その駆動力は約24時間周期の時計遺伝子発現リズムであることが近年明らかにされた。不眠や代謝異常などの生体リズム異常を標的とした創薬や治療の観点からも、細胞時計の制御機構を解明し、操作する技術が期待されている。しかし、時計遺伝子は転写調節配列を介してゲノム上で複雑に調節されており、細胞時計機構の解明と人為的制御には、個々の転写調節配列に直接作用できる人工分子が求められる。そこで本研究では、亜鉛フィンガー型DNA結合モチーフを用い、時計遺伝子プロモーター上の転写調節配列を標的とした人工転写因子を創製した。また、それによる細胞時計の位相制御を行った。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                          |    |       |
| 第一章 亜鉛フィンガー間の協同効果が人工転写因子の機能へ及ぼす影響                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                          |    |       |
| <p>人工転写因子によってゲノム上の標的配列を選択的に制御するためには、膨大なゲノム上の唯一のDNA配列を標的とするDNA結合ドメインが必要である。亜鉛フィンガーモチーフ(ZF)のDNA認識に関与するアミノ酸配列を置換することで、様々な3塩基対に対応するZFが報告されており、これを6つ組み合わせた6-亜鉛フィンガー(6ZF)は理論上、ゲノム上の唯一のDNA配列を標的とできる。しかし、複数のZF間での協同性に関する報告例はなく、作製した6ZFが実際に期待する結合能を有するかは不明である。そこで本章では、時計遺伝子mPer1プロモーターの転写調節配列であるE-boxを標的とするZF型人工転写因子を例に、6ZFのDNA結合配列選択性、転写活性化能と、これを構成するフィンガーモチーフ間の協同効果を調べた。</p> <p>mPer1にはE-boxが5つ存在する(E1-E5)。各E-boxへの選択性を付与するためE-box共通配列(CACGTG)とその周辺を含めた18塩基対を標的とする6ZFを設計した。ゲルシフト法、及びレポーターアッセイにより、DNA結合能選択性、親和性、及び細胞内転写調節能について検討した。その結果、E2、E4に対して作製した6ZFは高いDNA結合選択性、親和性、転写活性化能を示した。一方、E1、E3、E5に対して作製した6ZFはDNA結合性を示さず、単純なフィンガーの連結体が必ずしも十分なDNA結合能を持つとは限らないことが明らかになった。そこで連結化におけるフィンガーモチーフ間の協同性を調べるため、フィンガー欠失体を作製しDNA結合能を調べた。その結果、フィンガーの連結化はDNA結合能と転写活性化能に対して正だけではなく負の協同効果も生み出し、隣り合うフィンガーの組み合わせが連結体全体のDNA結合性に影響を及ぼしていることを見出した。</p> |                          |    |       |

## 第二章 人工転写因子を用いた細胞時計の位相制御

生体リズムは細胞時計のリズム位相が同調することで維持されている。細胞時計の位相をリセットし同調を誘導する因子としてグルココルチコイドが知られている。その機構として時計遺伝子mPer1のグルココルチコイド応答配列(GRE)の関与が示唆されているが、GREは様々な遺伝子に存在しており、直接的な寄与は明らかではない。細胞時計の同調機構を解明し操る上で、mPer1 GRE選択的に作用する人工分子が必要である。そこで本章では、細胞時計の位相を制御することを目的として、mPer1プロモーター上のGREを直接標的とする人工転写因子ZF(GRE)を創製した。クロマチン免疫沈降を行った結果、ZF(GRE)はゲノム上の標的配列に対して非常に高い選択性を有することがわかった。さらに時計遺伝子プロモーター駆動のルシフェラーゼレポーターベクターを用いて生物発光を経時的に測定したところ、ZF(GRE)を発現させた細胞において発光リズムの増強が観察された。これは時計遺伝子発現リズムが同調した結果であると推察される。このことを確かめるため、細胞時計リセットに伴い時計遺伝子発現の位相がシフトする現象に着目した。ZF(GRE)による位相シフトに関して検討するため、リガンドによりZF(GRE)の機能を制御できるドメインを融合した。様々な時刻でリガンドを添加したところ、時計遺伝子発現リズム位相の前進あるいは後退が誘起された。すなわち、ZF(GRE)がmPer1 GREに作用することにより細胞時計がリセットされたことが示唆される。

本研究では、ZFを用いてゲノム上の複雑な転写機構に作用可能な分子ツールを創製し、細胞時計の位相を操ることに成功した。ZF型人工転写因子は、多くの遺伝子発現に影響を与えるホルモン等とは異なり、標的に対し高い選択性を有するため、生体リズムの人為的な制御を行う上で有用であると考えられる。またゲノムレベルでの時計遺伝子プロモーター機能解析に向けた分子ツールとしても期待される。

(論文審査の結果の要旨)

近年、生体リズムの駆動力として細胞内の時計遺伝子群で構成される時計機構が発見された。生体リズムに基づく創薬や治療の観点からも、細胞時計の制御が試みられている。しかし、薬剤等を用いた従来法では様々な遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性があり、細胞時計機構の解明と制御方法の確立には、時計遺伝子のみには作用する手法が不可欠である。申請者は、ZFを組み合わせて時計遺伝子に直接作用する人工転写因子の創製と、これを用いた細胞時計の制御を目指して独創的かつ先駆的な研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得た。

まず、第一章では、ZF型人工転写因子の創製に関して、時計遺伝子mPer1の転写調節配列E-boxを標的とする人工転写因子を設計した。各E-boxとその周辺配列を標的とするZF 6 連結体を作製し、結合性を調べた結果、標的配列に対し高い結合選択性を持つことが明らかとした。このことから個々のE-boxへの選択性の付与に周辺配列も標的にすることが有効であることが示唆された。同時に、ZFの連結化がDNA結合性に対し協同効果を与えることも見出し、特定の遺伝子を制御するための人工転写因子の設計に関して重要な知見を提供した。

次に、第二章では、細胞時計のリセットへの関与が示唆されるmPer1 dGRE配列を標的とするZF(dGRE)を作製した。様々な遺伝子のGREに対して結合性を検討した結果、ゲノム上の標的配列に高い選択性を有することがわかった。これにリガンド添加によりその機能を制御可能なスイッチシステムを導入し、細胞内で発現させたところ、リガンド添加により、細胞時計のリズム増強及び位相シフトが確認された。この結果は人工分子を用いて細胞時計を直接的に制御した初めての報告であり、非常に重要な成果といえる。

以上、著者はZFを用いてゲノム上の標的DNA配列に作用可能な分子を創製し、細胞時計の位相を操ることに成功した。本論文は細胞時計の人為的制御に関して非常に多くの有益な知見を提供するものであり、ZF型人工転写因子を用いた生体リズム治療や時計遺伝子プロモーター解析といった今後の研究に、大きな影響を与えると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降